

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-155103

(43)公開日 平成7年(1995)6月20日

| (51)Int.Cl. <sup>8</sup> | 識別記号  | 庁内整理番号    | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|-------|-----------|-----|--------|
| A 2 3 C                  | 9/127 |           |     |        |
| // C i 2 N               | 1/16  | G 8828-4B |     |        |
|                          | 1/20  | A 8828-4B |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数1 書面 (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平5-345082

(22)出願日 平成5年(1993)12月8日

(71)出願人 594013066

四国乳業株式会社

愛媛県松山市三番町8丁目325番1

(72)発明者 永井 清一郎

松山市高野町甲79番地15

(72)発明者 桑原 雄二

愛媛県温泉郡川内町大字南方640番地4

(74)代理人 弁理士 長尾 貞吉

(54)【発明の名称】 乳酸菌発酵液の製造方法

(57)【要約】

【目的】 乳酸菌を利用して得た発酵乳を、乳酸菌が分泌した菌体外酵素を利用して更に熟成させ、乳の熟成過程において生成される生理活性物質を得ることを目的とする。

【構成】 複数種の乳酸菌、必要に応じてビフィズス菌を個別的に乳に接種し、この接種したものを各菌の生育最適温度環境下で各々個別的に適當時間培養後、得られた各培養菌液を個別的に適當量採取し、必要には応じて酵母液と共に一括して乳に接種したものを異なる温度環境下で適當時間培養したる後、各温度別に得られたスターターを所定の割合で乳に添加し恒温環境下で一定時間培養後、得られた発酵カードから発酵液を抽出する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数種の乳酸菌、必要に応じてビフィズス菌を個別的に乳に接種し、この接種したものを各菌の生育最適温度環境下で各々個別的に適当時間培養後、得られた各培養菌液を個別的に適当量採取し、必要に応じて酵母液と共に一括して乳に接種したものを異なる温度環境下で適当時間培養したる後、各温度別に得られたスターターを所定の割合で乳に添加し恒温環境下で一定時間培養後、得られた発酵カードから発酵液を抽出したことを特徴とする乳酸菌発酵液の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、完全食といわれる乳を利用した抗癌作用、免疫賦活作用、整腸作用、抗菌作用、抗変異原効果がある人体に対して有用な乳酸菌発酵液の製造方法に関するもので、更に詳しく説明すれば複数種の乳酸菌と酵母を共生培養し、その代謝産物である生理活性物質に富んだ乳酸菌発酵液の製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 近年人類の癌死亡率は急速に増加している。癌の原因となる化学発癌物質はそれ自体若しくはその代謝活性物質がDNAを修飾する変異原物質である。この変異原物質の作用を抑制する抗変異原物質が食品に含まれていることが近年明らかになり、抗癌作用を有する物質の研究開発が盛んになっている。

【0003】 従来、癌に対する治療効果のある物質として抗癌作用を有するインクマリン系化合物として知られている抗生物質MI43-37F11の類縁体であるインクマリン誘導体に関するもの（例えば、特開平5-97841号）や、抗癌作用のある喜樹という植物エキスを原料に用いている塩酸イリノテカン等が存在する。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、原材料が天然物であると否とを問わず、現存する全ての抗癌剤は、癌細胞に限らず正常な細胞をも破壊し、白血球減少等の副作用を招来しているという問題点がある。

【0005】 そこで、本発明は、食品に備わる機能を微生物を利用して有用な生理活性物質を引き出し、身体に副作用等を及ぼさない抗癌、抗菌、抗変異原効果のある乳酸菌発酵液の製造方法を提供することを目的とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者は完全食といわれる乳にはカゼイン、ラクトアルブミン等の乳蛋白質が存在し、該乳蛋白質のアミノ酸配列の中には種々の生理活性を有するペプチドと同一若しくは極めてこれに近い分子配列を有するものがあり、乳蛋白質が特定の蛋白分解酵素により分解されれば生理活性物質が遊離することに着目し、本発明を創案するに至った。即ち、ペプチド等の生理活性物質を乳蛋白質より遊離する特定の酵素は

乳酸菌が分泌した菌体外酵素が好適であるという発想の下に、乳酸菌による発酵乳を生成し、該生成物をさらに熟成させ、この熟成過程において乳中の蛋白質、脂質等が分解されて、人体に対して有用な生理活性物質であるペプチド、脂肪酸等の低分子の有機酸を得るものである。

【0007】 その手段として、本発明乳酸菌発酵液の製造方法は、大別して前培養、本培養、乳酸菌発酵液の抽出という3工程より構成される。前培養としては、複数種の乳酸菌、必要に応じてビフィズス菌を各々個別的に単菌で乳に接種し、この接種したものを各菌の生育最適温度環境下で個別的に培養する。一方、酵母を乳に接種し、至適温度環境下で適当時間培養する。この酵母は乳中に培養することなく、ビタミン、アミノ酸等を含有する栄養液に添加したものであってもよい。

【0008】 次に、前記前培養により得られた各培養菌液を各々個別的に採取し、一括して乳に接種したものを異なる温度環境下で適当時間培養する本培養を行う。

【0009】 前記本培養により各温度別に得られたスターターを所定の割合で乳に添加し、さらに恒温環境下で適当時間培養する。この培養により得られた発酵カードから発酵液を抽出する。

## 【0010】

【作用】 乳酸菌を単菌で乳に接種し、最適温度で培養すると、乳酸菌が増殖し、乳酸菌の代謝産物に富んだ発酵乳を生成する。

【0011】 複数種の乳酸菌と酵母を共生培養すると、構成菌種間には複雑な共生関係が生じる。菌はその自己増殖性により、代謝産物を菌体外に産生する。菌体外酵素としては、蛋白分解酵素、脂質分解酵素、糖質分解酵素等を生成し、乳酸菌にとって最適な環境を形成する。そのため乳酸菌が一層活性化し、菌にとって有利な物質をより一層生成する。このような乳酸菌にとっての最適環境下において、乳酸菌はその機能を十分に発揮し、菌にとって有利な産生物を産生する。産生物は例えばダイアセチル、アセトイン、クエン酸等の香気成分やナイシン等の抗菌成分、低分子のアミノ酸や有機酸等、構成菌により決定される。この共生培養を異なる温度環境下で行うと、その温度が至適温度である菌が増殖活性し、代謝産物を一層多量に産生する。このように本発明が乳酸菌が分泌した菌体外酵素を利用するのは、バランスのとれた生理活性物質の混合物を得るためであり、外来性の酵素では本発明の如くバランスのとれた生理活性物質の混合物を得ることが出来ないためである。

【0012】 各温度別に得られたスターターを所定の割合で乳に添加し、培養すると、生成された乳酸により発酵液のpHが低下し、等電点付近で発酵カードを形成する。即ち、乳酸菌により分泌された蛋白分解酵素が、カゼインを生成してカゼインを含む発酵カードを生成するものである。そして、発酵カードより抽出した発酵液は

菌の共生培養により産生したペプチド等の生理活性物質を含むものである。

【0013】

【実施例1】以下、本発明の好適な実施例について説明する。ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシス・ラクチス (*Lc. lactis subsp lactis*)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシス・クレモリス (*Lc. lactis subsp cremoris*)、ストレプトコッカス・ラクチス・サブスピーシス・ダイアセチラクチス (*Str. lactis subsp diacetylactis*)、ロイコノストック・クレモリス (*Leu. cremoris*) を各々個別的に約25% (W/W) 濃度以下の獣乳に接種し、前記各菌の最適温度による恒温環境下で各々48時間を限度として培養する。これらの乳酸菌を最適温度環境下で培養すると、これらの乳酸菌が個別的に獣乳中で増殖し、その産生乳酸により酸度約0.9% (W/W) 程度の弱い発酵乳が各別に生成される。ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシス・テルモフィルス (*Str. salivarius, subsp. thermophilus*)、ラクトバチルス・デルブリッキー・サブスピーシス・ブルガリクス (*Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*)、ラクトバチルス・デルブリッキー・サブスピーシス・ラクチス (*Lb. delbrueckii subsp. lactis*)、ラクトバチルス・ヘルベティクス (*Lb. helveticus*) を各々個別的に25% (W/W) 以下の濃度の獣乳に接種し、これらの菌の最適温度による恒温環境下で48時間を限度として培養する。前記条件下で培養すると、これらの乳酸菌が獣乳中で増殖し、酸度が約1.0% (W/W) 程度の発酵乳が個別的に生成される。ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lb. acidophilus*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lb. casei*) ビヒズス菌 (*Bifidobacterium longum*) を各々個別的に0.5% (W/W) の大豆ペプチドを含有する約25% (W/W) 以下の濃度の獣乳に接種し、これらの菌の最適温度である恒温環境下で48時間を限度\*

\*として培養する。この培養により、前記菌株の活性化を高める。サッカロマイセスセレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) を酵母エキス及びぶどう糖を含有する獣乳に接種し、約30~32℃で約48時間を限度として培養する。サッカロマイセスセレビジエは乳に培養することなく、ビタミン、アミノ酸を含有する水溶液に添加した酵母液であってもよい。酵母は、サッカロマイセスセレビジエに限定することなく、サッカロマイセス・デルブリッキー (*Sacc. delbrueckii*)、トルロプシス・ケフィール (*Torulopsis kefir*)、乾燥酵母等を使用することもできる。

【0014】上記前培養により得た各培養菌液を濃度約25% (W/W) 以下の獣乳に各々同量宛接種する。接種量は、獣に対し、夫々0.01~4.00% (V/V) 程度であるが、2.00% (V/V) 以下であることが好ましい。接種後、22~40℃の範囲内で高温、中温、低温の各温度を選択し、各恒温環境下で夫々約24~60時間培養した。高温環境下で培養したものをスターター1、中温環境下で培養したものをスターター2、低温環境下で培養したものをスターター3とする。スターター1、スターター2、スターター3を400倍率で顕微鏡観察を行った結果、スターター1には、酵母が1視野に1個、乳酸菌は桿菌と球菌が8対2の割合で存在し、全体としては長桿菌が多く観察された。スターター2には、酵母が1視野に3個、乳酸菌は桿菌と球菌が同一割合で存在し、長桿菌、短桿菌、単球菌、双球菌、連鎖球菌が共にバランスよく生育していることが判明した。スターター3には、酵母が10視野に1個、乳酸菌は桿菌と球菌が3対7の割合で全体的に球菌が多く、とりわけ双球菌が多いことが判明した。前記スターター1、スターター2、スターター3を下記に示す表1の組成に従って獣乳へ添加し、約22~40℃で各時間培養した。培養時間が長時間であるのは、乳酸菌と酵素の共生により、一層生理活性物質に富んだ代謝産物を得るためである。

【0015】

【表1】

|         | 培養時間<br>(単位:hour) | スターター1 | スターター2 | スターター3 |
|---------|-------------------|--------|--------|--------|
| 乳酸菌発酵液1 | 120               | 0.05%  | 0.1%   | 0.05%  |
| 乳酸菌発酵液2 | 120               | 0.05%  | 0.05%  | 0.1%   |
| 乳酸菌発酵液3 | 72                | 0.05%  | 0.05%  | 0.1%   |

【0016】得られた発酵カードのpH、乳酸菌数、酵母数は下記に示す表2の通りであった。

【0017】

【表2】

|         | pH   | 乳酸菌数 (個/ml)       | 酵母数 (個/ml)        |
|---------|------|-------------------|-------------------|
| 乳酸菌発酵液1 | 3.52 | $5.0 \times 10^8$ | $9.3 \times 10^4$ |
| 乳酸菌発酵液2 | 3.58 | $5.0 \times 10^8$ | $6.7 \times 10^4$ |
| 乳酸菌発酵液3 | 3.78 | $5.0 \times 10^8$ | $1.3 \times 10^4$ |

【0018】得られた発酵カードを個別的に約70℃迄加熱しながら攪拌する。この攪拌加熱処理により、発酵カードは固形物と液体に分離される。攪拌終了後、放置し室温迄冷却せしめた後、固形物の排除を行う。排除方法は如何なる方法であってもよいが、本実施例ではメリタフィルタペーパー（メリタジャパン株式会社の商品名）で濾過し、得られた濾液を約80℃の加熱殺菌処理後冷却し、乳酸菌発酵液を得る。この加熱殺菌処理は行わなくてもよい。後述の試験例に示す通り、発酵カードから排除された乳酸菌発酵液自体が極めて強い抗菌作用を有するためである。

【0019】

【実施例2】前述の実施例1と同様に、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシズ・ラクチス、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシズ・クレモリス、ストレプトコッカス・ラクチス・サブスピーシズ・ダイアセチラクチス、ロイコノストック・クレモリスを各々個別的に約25% (W/W) 以下の濃度の獣乳に接種し、前記各菌の最適温度による恒温環境下で各々48時間を限度として培養する。これらの乳酸菌を最適温度環境下で培養すると、これらの乳酸菌が個別的に獣乳中で活性化し、増殖する。ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシズ・テルモフィルス、ラクトバチルス、デルブリッキー・サブスピーシズ・ブルガリクス、ラクトバチルス・デルブリッキー・サブスピーシズ・ラクチス、ラクトバチルス・ヘルベティクスを個別的に濃度約25% (W/W) 以下の獣乳に接種し、これら各菌の最適温度による恒温環境下で48時間を限度として培養する。ラクトバチルス・アシドフィラス、ラクトバチルス・カゼイを各々個別的に0.5% (W/W) の大豆ベブチドを含有する濃度約25% (W/W) 以下の獣乳に接種し、これら各菌の最適温度環境下で約48時間を限度として培養する。サッカロマイセスセレビジエを酵母エキス及びぶどう糖を含有する乳に接種し、約30～32℃で約20～25時間培養する。この酵母サッカロマイセスセレビジエは乳に培養することなく、ビタミン、アミノ酸を含有する水溶液に溶解した酵母液であってもよい。前述の実施例1と同様に乾燥酵母を使用してもよい。

【0020】上記前培養により得た各培養菌液を濃度約25% (W/W) 以下の獣乳に各々同量宛接種する。接

種量は獣乳に対し、夫々0.01～4.00% (V/V) で特に2.00% (V/V) 以下であることが好ましい。接種後、22～40℃の範囲内で高温、中温、低温の各温度を選択し、各恒温環境下で夫々約24～60時間培養した。高温環境下で培養したものをスターター1、中温環境下で培養したものをスターター2、低温環境下で培養したものをスターター3とする。前記スターター1、スターター2、スターター3を終濃度で0.1%になるように獣乳に添加した。約31℃で120時間静置培養し、発酵カードを得た。得られた発酵カードのpHは3.5、乳酸菌数 $1.3 \times 10^9$  / ml、酵母数 $8.8 \times 10^8$  個/mlであり、120時間の培養によっても乳酸菌の生存率が高いことが判明した。この発酵カードを攪拌しながら約70℃まで加熱し、固形物分とその浸出液とを分離後、放置して室温まで冷却し、前述の実施例1と同様に濾過等の手段により濾液を得る。得られた濾液は、約80℃の加熱殺菌処理後冷却し、乳酸菌発酵液を得る。前述の実施例1と同様に濾液の殺菌処理は、その強い抗菌作用ゆえに必ずしも必要ではない。本実施例により得た乳酸菌発酵液は、pH3.5、乳酸酸度1.8% (W/W) {糖度6.7% (W/W)、窒素(N)含有量0.07% (W/W)であり、窒素含有量を乳蛋白質に換算すると0.46% (W/W)であった。

【0021】上述の実施例1、2においては、連鎖球菌属 (Streptococcus)、乳酸桿菌属 (Lactobacillus)、ロイコノストック属 (Leuconostoc) のものを乳酸菌として使用したが、本発明はこれに限定されるものではなく、他の属に該当するあらゆる種類の乳酸菌を使用する場合も本発明に含まれる。又、培養時間、温度、本培養における接種比率等も上述の実施例1、2に示される値に限定されず、これら以外の値によるものも本発明に含まれる。得られた乳酸菌液が味等において変化は見られる場合はあるものの、その作用効果は同じであるからである。

【0022】又、上記実施例に示す如く、食品に備わる機能を微生物を使用して菌体外酵素を引き出し、生理活性物質を得る方法は、乳と乳酸菌により生理活性物質を得る製造方法のみならず、例えば納豆等からでも調整可能である。

【0023】

【試験例1】6種類の菌株大腸菌エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)、腸炎ビブリオ菌 (Vibrio Parahaemolyticus)、サルモネラ菌 (Salmonella typhimurium)、ビフィドバクテリウム・ブフィダム (Bifidobacterium bifidum)、クロストリディウム・スポロジェネス (Clostridium sporogenes)、バクテロイデス・ブルガタス (Bacteroides vulgatus) を試験菌として使用し抗菌活性の測定をした。抗菌活性の測定はペーバーディスク法で行った。寒天平板培地10ミリリットルに乳酸菌発酵液50マイクロリットルを含浸させたペーバーディスクをのせ、48時間培養した。ディスクの周囲に形成した円形透明な阻止円 (溶菌班) の直径を測定し、コントロールディスク (pH3.5の乳酸水溶液50マイクロリットル) と比較した。その結果は下記の表3に示す通り、乳酸菌発酵液はNo. 5を除いて腸炎ビブリオ菌及びサルモネラ菌に対して抗菌活性が認められたが、No. 1では大腸菌とクロストリディウム・スポロジェネスに対し、No. 3は大腸菌に対し、No. 4は大腸菌とバクテロイ

\* デス・ブルガタスに対して抗菌活性が検出された。表3中、試料1、2、3は前記表2に示す乳酸菌発酵液1、乳酸菌発酵液2、乳酸菌発酵液3、試料4は実施例2で得た乳酸菌発酵液、5はビフィズス菌 Bifidobacterium longum を単菌で培養して得た乳酸菌発酵液、6はラクトバチルス・ラクチス (Lactobacillus lactis) を単菌で培養して得た乳酸菌発酵液、7はラクトバチルス・ブルガリカス (Lactobacillus bulgaricus) を単菌で培養して得た乳酸菌発酵液、8はラクトバチルス・アシドフィラス (Lactobacillus acidophilus) を単菌で培養して得た乳酸菌発酵液、9はストレプトコッカス・テルモフィラス (Streptococcus thermophilus) を単菌で培養した乳酸菌発酵液10はコントロールである。++は溶菌班の直径が15mm以上、+は溶菌班の直径が10mm以上、±は溶菌班の直径が10mm未満、-は溶菌班が観察されないことを示すものである。

【0024】

【表3】

| 試料番号                              | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| pH                                | 3.4 | 3.6 | 3.8 | 3.5 | 4.8 | 3.5 | 3.6 | 3.8 | 4.1 | 3.4 |
| 大腸菌<br>E.coli                     | +   | -   | +   | +   | -   | -   | ±   | -   | -   | -   |
| 腸炎ビブリオ菌<br>Vibrio                 | +   | ±   | ++  | ++  | -   | ++  | -   | ++  | ±   | -   |
| サルモネラ菌<br>Salmonella              | ++  | +   | ±   | +   | -   | +   | +   | ±   | -   | -   |
| ビフィド<br>バクテリウム<br>Bifidobacterium | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| クロストリディウム<br>Clostridium          | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| バクテロイデス<br>ブルガタス<br>Bacteroides   | -   | -   | -   | ±   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |

【0025】

【試験例2】7種類の菌株大腸菌 (Escherichia coli)、腸炎ビブリオ菌 (Vibrio parahaemolyticus)、サルモネラ菌 (Salmonella typhimurium)、ビフィドバクテリウム・ブフィダム (Bifidobacterium bifidum)、クロストリディウム・スポロジェネス (Clostridium sporogenes)、バクテロイデス・ブルガタス (Bacteroides vulgatus)、スタフィロ

コッカス アウレウス (Staphylococcus aureus) を試験菌として使用し抗菌活性の測定をした。抗菌活性の測定はペーバーディスク法で行った。寒天平板培地10ミリリットル上に乳酸菌発酵液50マイクロリットルを含浸させたペーバーディスクをのせ、48時間培養した。ディスクの周囲に形成した円形透明な阻止円 (溶菌班) の直径を測定し、コントロールディスク (pH3.5の乳酸水溶液50マイクロリットル) と比較した。試料は、乳酸菌発酵液5ミリリットルを凍結乾燥し、凍結乾燥標品を蒸留水に溶解した。水酸

化ナトリウム水溶液でpHを3.6に調整し、最終の容量を1ミリリットルとして乳酸菌発酵液の5倍濃縮液とした。その結果は、下記の表4に示す通り、5倍濃縮液の抗菌活性はNo. 5を除いて、用いたすべての試験菌に対して抗菌活性が認められた。特にNo. 1とNo. 4は大腸菌とクロストリディウム スポロジェネスに\*

\* 対し強い抗菌活性が認められた。試料1~10は前記試験例1と同一の物で、結果を示す記号も同一意味を示す。

【0026】

【表4】

| 試料番号                              | 1  | 2  | 3  | 4  | 5 | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 |
|-----------------------------------|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|
| 大腸菌<br>E.coli                     | ++ | +  | +  | ++ | - | ++ | +  | +  | +  | -  |
| 腸炎ビブリオ菌<br>Vibrio                 | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | -  |
| サルモネラ菌<br>Salmonella              | ++ | ++ | ++ | ++ | ± | ++ | ++ | ++ | ++ | -  |
| ビフィド<br>バクテリウム<br>Bifidobacterium | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  | ±  | ±  | -  |
| クロストリディウム<br>Clostridium          | ++ | +  | +  | ++ | + | +  | +  | +  | ±  | -  |
| バクテロイデス<br>ブルガタス<br>Bacteroides   | +  | +  | +  | +  | - | +  | +  | +  | +  | -  |
| スタフィロコッカス<br>Staphylococcus       | +  | +  | +  | +  | - | +  | +  | +  | +  | -  |

【0027】

【試験例3】7種類の菌株大腸菌 (*Escherichia coli*)、腸炎ビブリオ菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*)、ビフィドバクテリウム ブフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリディウム スポロジェネス (*Clostridium sporogenes*)、バクテロイデス ブルガタス (*Bacteroides vulgatus*)、スタフィロコッカス アウレウス (*Staphylococcus aureus*) を試験菌として使用し、乳酸菌発酵液のアセトン分画と抗菌活性の測定をした。抗菌活性の測定はペーバーディスク法で行った。寒天平板培地10ミリリットル上に乳酸菌発酵液50マイクロリットルを含浸させたペーバーディスクをのせ、48時間培養した。ディスクの周囲に形成した円形透明な阻止円 (溶菌班) の直径を測定し、コントロールディスク (pH3.5の乳酸水溶液50マイクロリットル) と比較した。アセト

ン分画の方法は乳酸菌発酵液1ミリリットルに6.7倍量の冷アセトン (-20℃) を加え、遠心分離 (3000rpm×5min) によって上清と沈殿区分を減圧下で乾燥し、蒸留水に溶解してpHを3.5に調整した。最終の溶解容量を1ミリリットルとし、その50マイクロリットルを抗菌活性の測定に用いた。上清区分についてはアセトン臭がなくなるまで減圧下で濃縮し、蒸留水を加え溶解してpHを3.5に調整した。最終の容量を1ミリリットルとし50マイクロリットルを抗菌活性の測定に用いた。その結果は、下記の表5に示す通り、アセトン沈殿区分の抗菌活性サルモネラ (*Salmonella*) に対して試料1、2、3及び6に抗菌活性が認められた。この活性成分は比較的分子量の大きいペプチドまたはタンパク質であると考えられる。試料1~10は前記試験例1及び2と同一物で、結果を示す符号も同一意味を示す。

【0028】

【表5】

| 試料番号                              | 1  | 2  | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------------------------------|----|----|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 大腸菌<br>E.coli                     | -  | -  | - | - | - | - | - | - | - | -  |
| 腸炎ビブリオ菌<br>Vibrio                 | -  | -  | - | - | - | - | - | - | - | -  |
| サルモネラ菌<br>Salmonella              | ++ | ++ | + | - | - | + | - | - | - | -  |
| ビフィド<br>バクテリウム<br>Bifidobacterium | -  | -  | - | - | - | - | - | - | - | -  |
| クロストリディウム<br>Clostridium          | -  | -  | - | - | - | - | - | - | - | -  |
| バクテロイギス<br>ブルガタス<br>Bacteroides   | -  | -  | - | - | - | - | - | - | - | -  |
| スタフィロコッカス<br>Staphylococcus       | -  | -  | - | - | - | - | - | - | - | -  |

【0029】アセトン上清区分の抗菌活性は下記の表6に示す通りである。表6に示すように、乳酸菌発酵液の抗菌活性は主としてアセトン分画上清区分に認められた。またアセトン分画することによりNo. 3とNo. 4にClostridiumに対する抗菌活性が検出されてくる。これはアセトン沈殿区分にその活性を中和す\*

\* 成分が含まれているため、分画により除去されたことを示すのであろう。試料1～10は前記試験例1、2及び3と同一物で、結果を示す符号も同一意味を示す。

【0030】

【表6】

| 試料番号                              | 1  | 2 | 3 | 4  | 5 | 6  | 7  | 8  | 9 | 10 |
|-----------------------------------|----|---|---|----|---|----|----|----|---|----|
| 大腸菌<br>E.coli                     | +  | - | - | +  | - | +  | +  | -  | - | -  |
| 腸炎ビブリオ菌<br>Vibrio                 | +  | + | + | ++ | - | ++ | ++ | ++ | + | -  |
| サルモネラ菌<br>Salmonella              | ++ | - | - | -  | - | -  | -  | -  | + | -  |
| ビフィド<br>バクテリウム<br>Bifidobacterium | +  | - | - | -  | - | -  | +  | -  | - | -  |
| クロストリディウム<br>Clostridium          | -  | - | + | +  | - | -  | -  | -  | - | -  |
| バクテロイギス<br>ブルガタス<br>Bacteroides   | -  | - | - | +  | - | +  | -  | -  | - | -  |
| スタフィロコッカス<br>Staphylococcus       | -  | - | - | -  | - | -  | -  | -  | - | -  |

【0031】

【試験例4】腸炎ビブリオ菌(Vibrio parahaemolyticus)を試験菌として、前述の実施例2で得た乳酸菌発酵液の腸炎ビブリオ菌に対する抗

菌活性のpH依存性について試験測定をした。抗菌活性の測定はペーパーディスク法で行った。寒天平板培地10ミリリットル上に乳酸菌発酵液50マイクロリットルを含浸させたペーパーディスクをのせ、48時間培養し

た。ディスクの周囲に形成した円形透明な阻止円(溶菌班)の直径を測定し、コントロールディスク塩酸水溶液50マイクロリットル、酢酸水溶液50マイクロリットル並びに乳酸水溶液50マイクロリットルと比較した。上述の実施例2の乳酸菌発酵液はpHを6.9に調整した後、遠心分離によって沈殿を除去し、上清を回収し、塩酸水溶液で個々のpHに調整し抗菌活性を測定した。対照として、蒸留水に塩酸、酢酸並びに乳酸を加え、同様のpHに調整したものについても抗菌活性を測\*

\*定した。その結果は下記の表7に示す通りである。乳酸菌発酵液の腸炎ビブリオ菌に対する抗菌活性はpH5.0以下で認められ、特にpH3.6以下では極めて強い。またpH3.0の酢酸水溶液に抗菌活性が認められるが、同じpHの塩酸水溶液及び乳酸水溶液には抗菌活性は認められない。表7中の結果を示す符号は前記表1～表6に示されるものと同一意味を示す。

【0032】

【表7】

| pH  | 6.0 | 5.8 | 5.6 | 5.4 | 5.2 | 5.0 | 4.8 | 4.6 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 発酵液 | -   | -   | -   | -   | -   | ±   | ±   | +   |
| 塩酸  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 酢酸  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 乳酸  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |

| pH  | 4.4 | 4.2 | 4.0 | 3.8 | 3.6 | 3.4 | 3.2 | 3.0 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 発酵液 | +   | +   | +   | ++  | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 塩酸  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 酢酸  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   |
| 乳酸  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |

【0033】

【試験例5】前記実施例1及び2で得た乳酸菌発酵液の抗変異原活性に関する試験を行った。化学発癌物質の多くは、それ自身が、またはその代謝活性物質がDNAを修飾する変異原物質である。抗変異原物質とはこの変異原物質の作用を阻害する物質のことで、発癌を防止するものを意味する。材料として供試菌株には、ヒスチジン要求性、アンピシリン耐性、フレームシフト型突然変異を有するサルモネラ菌TA98 (*Salmonella typhimurium* TA98) を使用する。変異原剤として3-アミノ-1-メチル-5H-ピリド[4,3-b]indole (Trp-P2) は0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) は10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で使用した。抗変異原活性の測定方法は、サルモネラ

変異原試験法(エームテスト)を応用した方法で、100マイクロリットルのTrp-P2(またはMNNG)、100マイクロリットルの乳酸菌発酵液及び100マイクロリットルのS-9ミックス(マイクロソーム標品)を混合し、次に100マイクロリットルのサルモネラ培養液を加え、36℃で20分間保持する2ミリリットルのピオチン-ヒスチジンを含む寒天溶液と混合し、ボグルーボンナー(Vogel-Bonner)E培地30ミリリットルに重層する。37℃で48時間培養し、コロニーを計数する。試験は三連で行った。その結果は、Trp-P2に対しては下記の表8に示すようにNo.4は最も強い抗変異原性(73%)を示した。

【0034】

【表8】



| 試料番号 | 発酵液+TA98の<br>自然復帰コロニー<br>(平均) | 平均コロニー<br>(三連) | [平均コロニー]-<br>[自然復帰コロニー] | 抗変異原活性<br>(%) |
|------|-------------------------------|----------------|-------------------------|---------------|
| 1    | 26                            | 1,110          | 1,084                   | 63            |
| 2    | 30                            | 1,475          | 1,445                   | 51            |
| 3    | 30                            | 1,592          | 1,562                   | 47            |
| 4    | 27                            | 832            | 805                     | 73            |
| 5    | 41                            | 2,753          | 2,712                   | 8             |
| 6    | 26                            | 1,099          | 1,073                   | 64            |
| 7    | 29                            | 1,436          | 1,407                   | 52            |
| 8    | 27                            | 1,855          | 1,828                   | 38            |
| 9    | 32                            | 2,179          | 2,147                   | 27            |
| 10   | 27                            | 2,975          | 2,948                   | 0             |

【0035】MNNGに対しては下記の表9に示すよう \*【0036】  
にNo1とNo4が強い抗変異原性(75%)を示し 【表9】

た。

\*20

| 試料番号 | 平均コロニー数<br>(三連) | [平均コロニー数]-<br>[ブランク値(88)] | 抗変異原活性<br>(%) |
|------|-----------------|---------------------------|---------------|
| 1    | 728             | 640                       | 75            |
| 2    | 894             | 806                       | 68            |
| 3    | 885             | 777                       | 69            |
| 4    | 721             | 633                       | 75            |
| 5    | 1,407           | 1,319                     | 48            |
| 6    | 1,529           | 1,441                     | 43            |
| 7    | 1,321           | 1,233                     | 52            |
| 8    | 1,672           | 1,584                     | 38            |
| 9    | 2,100           | 2,012                     | 21            |
| 10   | 88              | 0                         | -             |

【0037】上記表8及び9中試料1~10は前記試験例1~4と同一物である。

【0038】全体的に単菌で培養した乳酸菌発酵液より 40 も酵母菌を含む各種乳酸菌を共生させた培養液に、高い抗変異原性が認められる。即ち本発明の目的である得られた乳酸菌発酵液の抗菌作用、抗ガン作用、抗コレステロール作用など人間の健康維持に関係する生理活性因子が本発酵液(No. 1~No. 4)に存在することが表8及び表9により実証されている。

【0039】

【発明の効果】本発明は、化学的添加物を一切使用することなく、多種の乳酸菌と酵母の共生培養を特殊なスタ

ーターと共に行うため、乳酸菌及び酵母の代謝産物に富んだ生理活性物質を生成し、前記の試験例1~5の結果が示す通り本発明により得られた乳酸菌発酵液は抗菌作用、抗癌作用、免疫賦活作用、発癌物質の発現を抑制する抗変異原効果整腸作用等があり、人の健康を保持するのに顕著な効果がある。

【0040】又本発明は食品が元来有する機能を、微生物を使用し、菌体外酵素を引き出し、生理活性物質を抽出するという方法であるので身体に副作用を与えることなく、身体に作用するので安全であるという効果がある。そのため、得られた乳酸菌発酵液は医薬品のみならず、食品素材等、幅広い用途があるという効果がある。